

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПАНЕЛИ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАСПОРТИЗАЦИИ СИБИРСКОГО ОСЕТРА (*Acipenser baerii*)*

Н.В. БАРДУКОВ, А.К. НИКИПЕЛОВА, А.А. БЕЛОУС , Н.А. ЗИНОВЬЕВА

Сибирский осетр (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) — один из наиболее значимых видов рыб аквакультуры в России. Благодаря высокому спросу на ценную товарную продукцию, разведение сибирского осетра — перспективное направление в развитии отрасли. Однако селекционно-племенную работу с этим видом существенно осложняет наличие тетраплоидного генома, что в совокупности с необходимостью смешивания икры и спермы от нескольких производителей при получении потомства препятствует введению в практику хорошо зарекомендовавших себя молекулярно-генетических методов, таких как микросателлитный анализ. В настоящей работе впервые дана характеристика известным микросателлитным локусам у сибирского осетра с точки зрения возможности эффективного учета доз их аллелей в тетраплоидном геноме. Обнаружено семь локусов, соответствующих этому критерию. Целью нашей работы стало создание панели микросателлитных маркеров, адаптированной для использования в селекции сибирского осетра ленской популяции. Исследования проводили в 2023 году. В качестве биологического материала использовали срезы плавниковой ткани сибирского осетра ленской популяции, взятые от рыб экспериментального стада, содержащегося в установке замкнутого водоснабжения ФИЦ животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста. Экспериментальное стадо содержало две группы: I — рыбы, полученные на Можайском производственно-экспериментальном рыбоводном заводе (д. Горетово, Можайский городской округ, Московская обл.; $n = 42$), II — рыбы, полученные от ООО РТФ «Диана» (рабочий пос. Кадуй, Кадуйский р-н, Вологодская обл.; $n = 47$). ДНК выделяли помощью набора ДНК-Экстран-2 (НПК «Синтол», Россия) согласно протоколу фирмы-производителя. Качественную оценку ДНК осуществляли методом электрофореза в агарозном геле (1,2 % агарозы). ПЦР выполняли на амплификаторе Thermal Cycler SimpliAmp («Thermo Fisher Scientific, Inc», США). Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в системе капиллярного электрофореза Нанофор 05 (НПК «Синтол», Россия). Размеры аллелей определяли с помощью программного обеспечения GeneMarker (Version 3.0.1). Для каждого локуса определяли дозу каждого аллеля. Для тестирования использовали 27 микросателлитных маркеров: Ls 19, Aox 45, Aox 9, Ls 68, Agu 38, Ag 49a, Agu 37, Agu 41, Agu 15, Agu 51, Agu 59, Agu 34, Agu 36, Agu 46, Agu 56, Agu 54, AoxD 161, AfuG 63, AfuG 51, AfuG 112, An 20, Agu 13, Agu 18, Afu 68 b, Spl 163, AfuG41, Ls 39, ранее известных для осетровых видов рыб. Из них для включения в мультиплексные панели было отобрано семь (Agu 38, An 20, Agu 18, Ls 19, Ag 49a, Agu 37, Agu 41). На основании полиморфизма семи микросателлитных локусов для двух исследуемых групп особей сибирского осетра был выполнен расчет классических популяционно-генетических показателей: среднего числа аллелей на локус ($N_a = 6,86$), числа эффективных аллелей ($N_e = 3,61$), наблюдаемой ($H_o = 0,839$) и ожидаемой ($H_e = 0,6535$) гетерозиготности. Выявлено отсутствие инбридинга в исследуемых группах ($F_{IS} = -0,340$ и $-0,173$), а также наличие значительной генетической дифференциации между ними: значение генетической дистанции M. Nei составило 0,1340, индекс $F_{st} = 0,0796$. Группы сформировали два четких, практически не пересекающихся кластера на PCA-плоте, несмотря на то, что предки особей сибирского осетра у обеих групп имели изначально родственное происхождение. Был оценен вклад дозы аллеля тетраплоидного локуса в эффективность микросателлитного анализа: в среднем информативность каждого локуса повышалась на 32 %. Сопоставление результатов генетического анализа с имеющимися данными литературы позволяет предположить, что в аквакультуральных стадах сибирского осетра ленской популяции происходят процессы, связанные с изменением частот аллелей микросателлитных локусов, которые постепенно усиливают их генетическую дифференциацию. В результате работы была подтверждена высокая эффективность созданных панелей микросателлитных маркеров и их потенциальная пригодность для использования в генетической паспортизации — каждая особь сибирского осетра имела собственный генетический профиль. Распределение аллелей семи микросателлитных локусов указывало на формирование уникальной генетической структуры в стадах сибирского осетра в каждом из двух рыбоводных предприятий, которые были источниками рыбопосадочного материала.

Ключевые слова: микросателлиты, тетраплоиды, сибирский осетр, осетроводство, нуль-аллели.

* Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Государственное задание № FGGN-2022-0007.

Сибирский осетр (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) — один из наиболее значимых видов рыб, выращиваемых в условиях товарной аквакультуры. Основные преимущества сибирского осетра — быстрое накопление массы и высокая выживаемость в промышленных условиях разведения (1, 2). К важным факторам успешного разведения этого вида относится способность производить высококачественную икру. Благодаря экономической значимости и высокому спросу на продукцию сибирского осетра его разведение имеет значительный потенциал для развития аквакультуры (3).

В дикой природе сибирский осетр находится в статусе исчезающего вида вследствие загрязнения окружающей среды, бесконтрольного вылова, деградации естественной среды обитания. Вид занесен в Красную книгу Международного союза охраны природы и природных ресурсов МСОП (4). Кроме того, сибирский осетр включен в приложения 1 и 2 Конвенции о международной торговле видами дикой фауны и флоры, находящимися под угрозой исчезновения (Convention on International Trade in Endangered species of wild fauna and flora, CITES) (5). Неудовлетворительное состояние диких популяций обязывает сохранять биоразнообразие в стадах сибирского осетра на рыбоводных заводах и грамотно использовать генетический потенциал аквакультуральных популяций (6).

Современные методы племенной работы опираются на данные, получаемые с помощью молекулярной генетики. Это позволяет существенно ускорить и упростить работу по повышению продуктивности у сельскохозяйственных видов животных и растений (7-9). Однако в осетроводстве внедрение этих технологий в повседневную селекционную практику замедлилось. На сегодняшний день молекулярно-генетические маркеры (в первую очередь, микросателлиты и митохондриальная ДНК) применяются для контроля видовой принадлежности с целью дальнейшего использования молоди для восполнения природных популяций (10). Сложности разработки молекулярно-генетических панелей для индивидуальной идентификации сибирского осетра связаны с тем, что вид имеет тетраплоидный геном (11), при этом определенные локусы могут проявлять диплоидный или даже гексаплоидный характер (12, 13).

Применению молекулярно-генетических методов непосредственно в селекции сибирского осетра также препятствует продолжительное время созревания этого вида и сложившаяся на рыбоводных заводах система разведения, предполагающая смешивание половых продуктов от нескольких рыб-производителей. Это существенно снижает отход, повышает процент оплодотворенной икры, но и препятствует точному соотношению родителей и их потомков, что необходимо при проведении селекционной работы. Массовое внедрение на осетровых заводах индивидуального мечения рыб-производителей с использованием электронных чипов создает благоприятные предпосылки для применения молекулярно-генетических методов в племенной работе.

В настоящей работе впервые дана характеристика известным микросателлитным локусам у сибирского осетра с точки зрения возможности эффективного учета доз их аллелей в тетраплоидном геноме. Обнаружено семь локусов, соответствующих этому критерию.

Целью нашей работы стало создание панели микросателлитных маркеров, адаптированной для использования в селекции сибирского осетра ленской популяции.

Методика. Исследования проводили в 2023 году. В качестве биологического материала использовали срезы плавниковой ткани сибирского осетра ленской популяции, взятые от рыб экспериментального стада, со-

держась в установке замкнутого водоснабжения Федерального исследовательского центра животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста. Экспериментальное стадо было представлено двумя группами: I — рыбы, полученные на Можайском производственно-экспериментальном рыбноводном заводе (д. Горетово, Можайский городской округ, Московская обл.; $n = 42$), II — рыбы, полученные от ООО РТФ «Диана» (рабочий пос. Кадуй, Кадуйский р-н, Вологодская обл.; $n = 47$).

ДНК выделяли помощью набора ДНК-Экстран-2 (НПК «Синтол», Россия) согласно протоколу фирмы-производителя. Качественную оценку ДНК осуществляли методом электрофореза в агарозном геле (1,2 % агарозы). ПЦР проводили в конечном объеме 15 мкл. В пробирки вносили по 14 мкл реакционной смеси, состоящей из 1,5 мкл $10\times$ Turbo-буфера (ЗАО «Евроген», Россия), 1,5 мкл 2 мМ раствора dNTPs, 0,3 мкл 10 мМ смеси праймеров, 1 ед. Smart Taq-полимеразы (ЗАО «Диалат Лтд.», Россия), добавляли ~ 50-100 нг исследуемой геномной ДНК, доводили до конечного объема деионизированной водой. Реакции выполняли на амплификаторе Thermal Cycler SimpliAmp («Thermo Fisher Scientific, Inc», США) в следующем режиме: 10 мин при 94 °С (первичная денатурация); 30 с при 95 °С (денатурация), 40 с при 58 °С (отжиг праймеров на ДНК-матрице), 35 с при 72 °С (элонгацию цепей) (38 циклов); 5 мин при 72 °С (финальная элонгация). Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в системе капиллярного электрофореза Нанофор 05 (НПК «Синтол», Россия). Размеры аллелей определяли с помощью программного обеспечения GeneMarker (Version 3.0.1). Для каждого локуса определяли дозу каждого аллеля (14).

Апробацию собранных панелей проводили на I и II группах экспериментального стада сибирского осетра. Для каждой из групп рассчитывали классические популяционно-генетические показатели: ожидаемую (H_e) и наблюдаемую (H_o) гетерозиготность, среднее число аллелей на локус (N_a), среднее число эффективных аллелей (N_e), коэффициент инбридинга (F_{is}), генетические дистанции по методу М. Nei (15), индекс F_{st} (16, 17). Для обработки данных микросателлитного анализа использовали R-пакет Polysat (Version 1.7) (18), STRUCTURE (Version 2.3.4) (19), SPA Ge Di1-5d (20). PCA (Principal Coordinate Analysis)-плот был построен на основе вычисления генетических дистанций по методу R. Bruvo с соавт. (21).

Результаты. Поскольку необходимо было создать мультиплексные микросателлитные панели с единообразным характером плоидности локусов, а также отсутствием нулевых аллелей, отбор микросателлитных маркеров имел достаточно жесткие условия. Локус не должен был иметь более четырех аллелей у одного образца, не должен иметь нулевых аллелей, должен обладать стабильной амплификацией в ПЦР при условии мультиплексирования и полиморфизмом, доза каждого аллеля должна визуально хорошо определяться.

Для создания панели микросателлитных маркеров, предназначенной для индивидуальной идентификации и контроля достоверности происхождения сибирского осетра, мы протестировали 27 микросателлитных локусов: Ls 19, Aox 45, Aox 9, Ls 68 (22, 23), Agu 38, Ag 49a, Agu 37, Agu 41, Agu 15, Agu 51, Agu 59, Agu 34, Agu 36, Agu 46, Agu 56, Agu 54 (24), AoxD 161, AfuG 63, AfuG 51, AfuG 112, An 20, Aru 13, Aru 18, Afu 68 b, Spl 163, AfuG41, Ls 39 (25, 26). В ряде локусов (AoxD 161, AfuG 41, Agu 59) было идентифицировано более 4 аллелей (рис. 1), и такие локусы исключили из дальнейшего анализа.

Как известно, наличие нулевых аллелей приводит к искажению

статистических расчетов, завышая гомозиготность (27, 28). Виды с полиплоидными геномами имеют повышенный риск образования нулевых аллелей (29). Полиплоидизация может быть вызвана слиянием геномов, полиморфных по сайту отжига праймеров. Кроме того, считается, что сам процесс полиплоидизации сопровождается повышенной активностью транспозонов и потерей участков ДНК из-за геномных перестроек (30), что также может разрушать сайты связывания праймеров (31). В связи с этим определение дозы аллелей было критическим требованием при отборе локусов. Определение дозы каждого аллеля (рис. 2) позволило выявить локусы, предположительно имеющие нулевые аллели (AfuG 51, Aru 13, Agu 15).

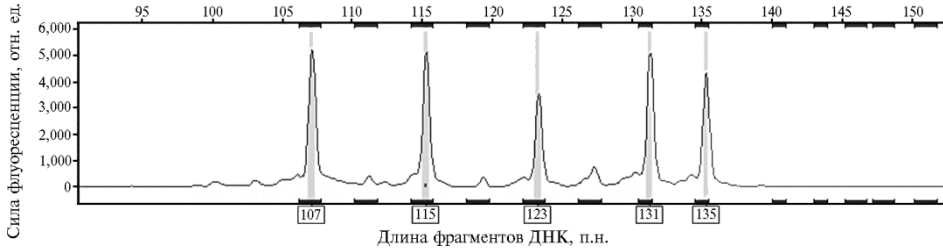


Рис. 1. Пример генетического профиля у особей одомашненной формы сибирского осетра (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) ленской популяции по локусу AoxD 161 с пятью выявленными аллелями (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2023 год).

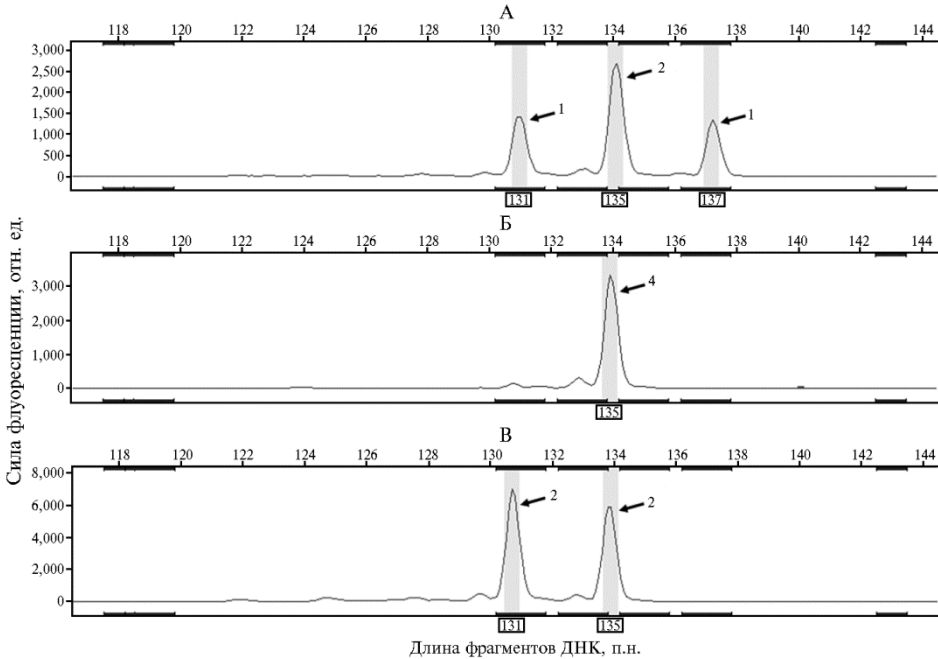


Рис. 2. Определение дозы каждого аллеля микросателлитного локуса Ls 19 у особей одомашненной формы сибирского осетра (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) ленской популяции: А — особь с соотношением аллелей 1/2/1, Б — особь с соотношением аллелей 4/0, В — особь с соотношением аллелей 2/2. Стрелками указаны пики, соответствующие аллелям, цифрами обозначены дозы аллелей — число хромосом в тетраплоидном геноме, несущих данный аллель (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2023 год).

Так, для микросателлитного локуса AfuG 51 было выявлено три аллеля с примерно одинаковым количеством полученного ПЦР-продукта (рис. 3). Поскольку геном сибирского осетра тетраплоидный, то четвертый аллель, скорее всего, должен быть нулевым, но мы наблюдали присутствие четвертого пика со слабым сигналом, который, вероятно, и был четвертым

аллелем с измененным сайтом отжига праймера.

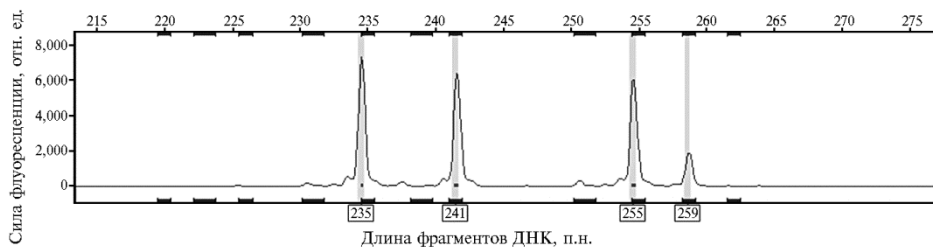


Рис. 3. Определение нуль-аллеля на примере локуса *AfuG 51* у особой одомашненной формы сибирского осетра (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) ленской популяции: 235, 241, 255 — три аллеля с примерно одинаковой эффективностью синтеза в ПЦР, 259 — четвертый пик с низким значением флуоресценции, вероятно, соответствует аллелю с измененным сайтом отжига праймера (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2023 год).

На небольшой выборке образцов ДНК сибирского осетра ($n = 16$) было проведено предварительное тестирование возможности мультиплексирования микросателлитных локусов, а также явного отклонения от тетраплоидного наследования. При этом подбор локусов для мультиплексной ПЦР также содержал требование сохранить возможность учета дозы аллелей при мультиплексировании ПЦР. В результате из 27 микросателлитных маркеров отобрали 7 позиций: *Agu 38*, *An 20*, *Agu 18*, *Ls 19*, *Ag 49a*, *Agu 37*, *Agu 41* (табл. 1, рис. 4), которые были скомпонованы в две мультиплексные панели (панель 1: *Agu 38*, *An 20*, *Agu 18*; панель 2: *Ls 19*, *Ag 49a*, *Agu 37*, *Agu 41*).

1. Характеристика микросателлитных локусов, отобранных для тестирования особой одомашненной формы сибирского осетра (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) ленской популяции (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2023 год)

Локус	Метка	Диапазон аллелей по данным литературы, п.н. (22-26)	Диапазон аллелей по результатам исследования, п.н.	Последовательность праймеров
Панель 1				
<i>Agu 38</i>	6-FAM	108-114	90-112	F: ACTGGGGTTGAAGGACAGTG R: TCCGTCTCATGTCCAAGGGTA
<i>An 20</i>	6-FAM	151-207	143-185	F: AATAACAATCATTACATGAGGCT R: TGGTCAGTTGTTTTTATTGAT
<i>Agu 18</i>	R6G	138-154	137-145	F: CCTGGAACACGTCACGTTTT R: TGGGTGAATGTTTTGGTGTG
Панель 2				
<i>Ls 19</i>	6-FAM	118-145	119-137	F: CATCTTAGCCGCTGGGTAC R: CAGGTCCCTAATACAATGGC
<i>Agu 37</i>	R6G	128-136	124-128	F: ACATGGTAGCAAATCCCAA R: CAGCAAGCTTAGATGCATGG
<i>Agu 41</i>	ROX	178-218	177-229	F: AAGACAAACAGTGGCCCAAC R: CAATGGCAGGTGCTACTGAA
<i>Ag49a</i>	6-FAM	198-219	192-218	F: TGTTATCTGCTCTGATATTGATTCC R: CGTTTTAAAGTTTGACGGCA

Результаты апробации собранных панелей в двух группах особей экспериментального стада сибирского осетра представлены в таблице 2.

2. Частота аллелей 7 микросателлитных локусов у особой одомашненной формы сибирского осетра (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) ленской популяции (расчет в программе SPAGeDi1-5d) (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2023 год)

Локус	Группа	Na	Ne	He	Ho	Fis	PIС
Все ($M \pm SEM$)	I + II	6,86±1,506	3,61±0,731	0,6535±0,07441	0,839±0,0976	-0,191±0,0778	
	I	4,43±0,519	2,90±0,476	0,5770±0,10235	0,816±0,1413	-0,340±0,1106	
	II	6,14±1,300	3,63±0,657	0,6744±0,05663	0,860±0,0653	-0,173±0,0590	
<i>Agu 38</i>	I + II	6	3,45	0,7102	0,989	-0,366	0,639
	I	5	3,13	0,6809	1,000	-0,460	0,609
	II	5	3,32	0,6993	0,979	-0,359	0,608
<i>An 20</i>	I + II	13	6,17	0,8379	0,989	-0,167	0,813

	I	6	3,98	0,7486	1,000	-0,335	0,688
	II	12	6,11	0,8365	0,979	-0,156	0,803
Agu 18	I + II	4	1,45	0,3122	0,337	0,231	0,396
	I	3	1,05	0,0471	0,048	0,330	0,301
	II	4	1,98	0,4943	0,596	0,091	0,447
Ls 19	I + II	5	2,47	0,5953	0,854	-0,158	0,526
	I	3	2,01	0,5028	0,857	-0,397	0,429
	II	5	2,67	0,6258	0,851	-0,172	0,526
Ag 49a	I + II	6	3,56	0,7193	0,966	-0,291	0,653
	I	4	3,05	0,6723	0,976	-0,411	0,591
	II	5	3,98	0,7491	0,957	-0,233	0,687
Agu 37	I + II	4	2,33	0,5703	0,753	-0,078	0,502
	I	4	2,56	0,6090	0,833	-0,184	0,519
	II	3	2,01	0,5036	0,681	-0,028	0,449
Agu 41	I + II	10	5,86	0,8295	0,989	-0,180	0,793
	I	6	4,51	0,7781	1,000	-0,282	0,724
	II	9	5,33	0,8123	0,979	-0,185	0,767

Примечание. I группа — рыбы, полученные на Можайском производственно-экспериментальном рыбобоводном заводе (д. Горетово, Можайский городской округ, Московская обл.; $n = 42$), II группа — рыбы, полученные от ООО РТФ «Диана» (рабочий пос. Кадуи, Кадуийский р-н, Вологодская обл.; $n = 47$). Но — наблюдаемая гетерозиготность, Не — ожидаемая гетерозиготность, На — среднее число аллелей на локус, Ne — среднее число эффективных аллелей на локус, Fis — коэффициент инбридинга, PIC — индекс полиморфного информационного содержания локуса.

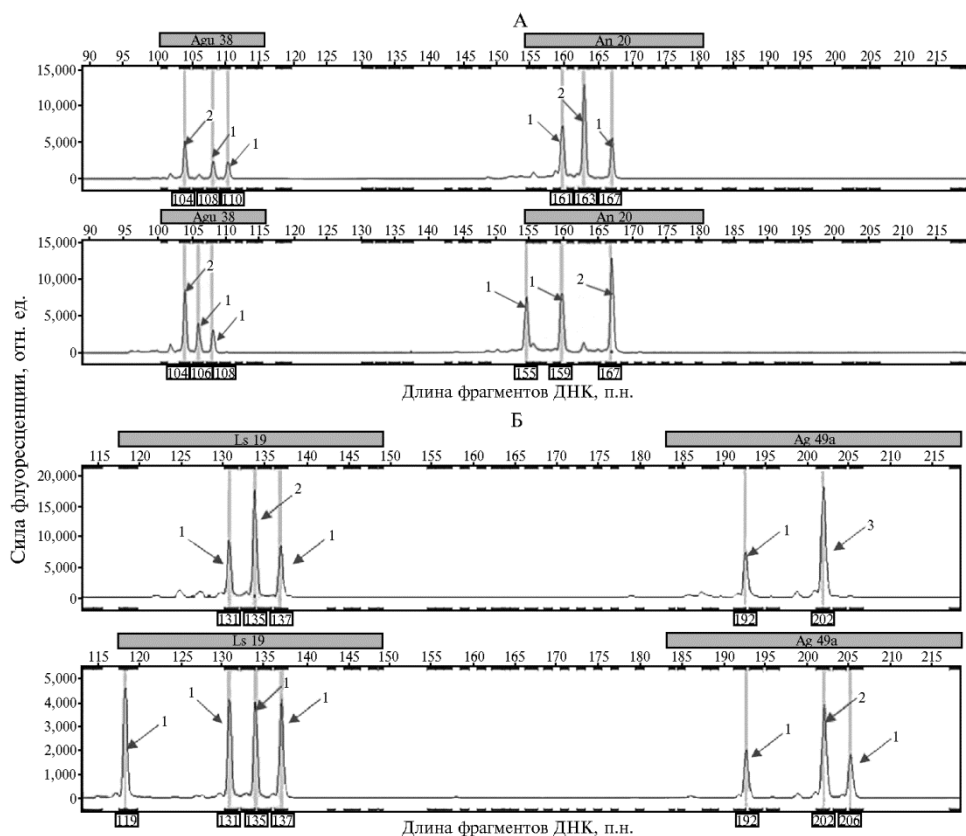


Рис. 4. Пример мультиплексирования локусов с сохранением эффекта дозы аллелей для особей одомашненной формы сибирского осетра (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) ленской популяции: А — панель № 1 (локусы Agu 38, An 20; канал FAM), Б — панель № 2 (локусы Ls 19, Ag 49a; канал FAM). Стрелками указаны пики, соответствующие аллелям, цифрами обозначены дозы аллелей (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2023 год).

В сумме из 7 микросателлитных локусов наиболее эффективными оказались An 20 и Agu 41, что можно заметить по значениям индекса полиморфного информационного содержания локуса (PIC). Несмотря на то, что исследуемая выборка состояла из объектов аквакультуры, происходящих от

дикого сибирского осетра ленской популяции, мы увидели четкую генетическую дифференциацию между исследуемыми группами экспериментального стада. Значение индекса фиксации F_{st} оказалось равным 0,0796, то есть 7,96 % изменчивости было обусловлено внутривидовыми различиями, а 92,04 % — межпопуляционными. Значение генетической дистанции, рассчитанное по М. Nei на основании частот аллелей 7 микросателлитных локусов, составило 0,1340. Генетическая дифференциация групп сибирского осетра хорошо выявлялась при формировании генетических кластеров в программе STRUCTURE (рис. 5), а также по результатам PCA-анализа (рис. 6).

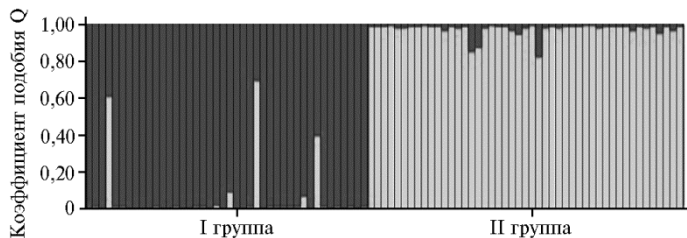


Рис. 5. Результаты кластерного анализа особей одомашненной формы сибирского осетра (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) ленской популяции, выполненного на основании частот аллелей 7 микросателлитных локусов в программе STRUCTURE для числа кластеров $K = 2$: I группа — рыбы, полученные на Можайском производственно-экспериментальном рыбноводном заводе (д. Горетово, Можайский городской округ, Московская обл.), II группа — рыбы, полученные от ООО РТФ «Диана» (рабочий пос. Кадуй, Кадуйский р-н, Вологодская обл.) (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2023 год).

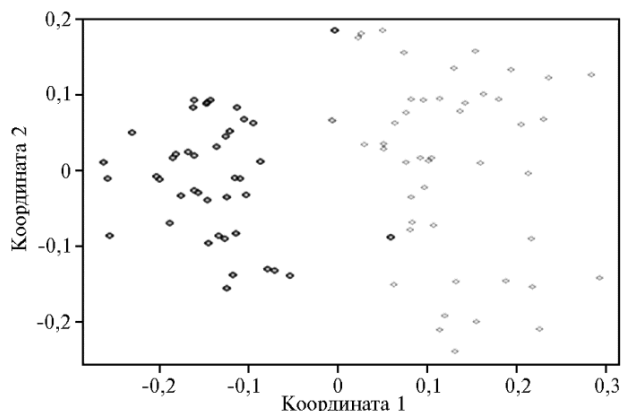


Рис. 6. Локализация особей сибирского осетра в пространстве двух измерений на основании генотипирования по 7 микросателлитным маркерам. I группа (черный цвет) — рыбы, полученные на Можайском производственно-экспериментальном рыбноводном заводе (д. Горетово, Можайский городской округ, Московская обл.), II группа (серый цвет) — рыбы, полученные от ООО РТФ «Диана» (рабочий пос. Кадуй, Кадуйский р-н, Вологодская обл.). PCA (Principal Coordinate Analysis)-плот построен на основе вычисления генетических дистанций по методу R. Bruvo с соавт. (21) (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2023 год).

Рассматривая полученные значения популяционно-генетических показателей, можно утверждать, что анализируемые группы сибирского осетра ленской популяции не являются инбредными. Учитывая относительно более низкие значения N_a , N_e , N_o и N_e , можно сделать вывод о меньшем генетическом разнообразии I группы, полученной на Можайском производственно-экспериментальном рыбноводном заводе. Этот эффект мог быть следствием ориентации завода на выпуск молоди осетровых для восполнения природных популяций и более жестких требований к происхождению производителей.

Поскольку для каждого микросателлитного локуса мы учитывали

эффект дозы аллеля, то сравнили разрешающую способность микросателлитного анализа при игнорировании данных по этому эффекту и при его учете. При учете эффекта дозы аллеля в среднем по каждому локусу получили увеличение числа генотипов на 31,75 % (табл. 3).

3. Число генотипов сибирского осетра (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) ленской популяции с учетом и без учета эффекта дозы аллеля (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2023 год)

Способ учета уникальных генотипов	Локус							
	Agu 38	An 20	Aru 18	Ls 19	Ag 49a	Agu 37	Agu 41	Σ
Без дозы аллеля	11	34	5	11	21	5	39	126
С учетом дозы	19	48	6	14	27	6	46	166

К сожалению, следует признать, что современное программное обеспечение для вычисления популяционно-генетических показателей плохо адаптировано для работы с данными по дозе аллеля микросателлитного локуса. Так, для конвертации файла данных с результатами генотипирования под форматы программ STRUCTURE и SPAGeDi мы использовали R-пакет Polysat, специально разработанный для анализа полиплоидных генотипов. При этом данные по дозе аллеля удалялись. Снижение качества анализа, однако, не приводило к критичным ошибкам при расчете популяционной статистики. В то же время при соотношении генетических профилей родителей и потомков это может оказать существенное воздействие и привести к необходимости включения в анализ большего числа микросателлитных маркеров. Такая ситуация будет особенно заметна для стад, где среди производителей есть большая доля сибсов и полусибсов.

Микросателлитный полиморфизм дикой ленской популяции сибирского осетра исследован достаточно подробно (10, 14). Многие авторы изучали особенности генетической структуры аквакультуральных стад этого вида, однако среди подобных работ можно выделить исследование А.Е. Барминцевой с соавт. (32), в котором проведена сравнительная характеристика полиморфизма стад сибирского осетра ленской популяции из девяти хозяйств по пяти микросателлитным локусам. Как и в нашем исследовании, авторы выделили два четких генетических кластера, но характер их формирования имел существенные различия. Авторы отмечают необычный эффект — на принадлежность конкретной особи к кластеру определяющее значение оказывал год ее рождения. Независимо от принадлежности к хозяйству, особи генераций 1990-1996 годов образовывали единый кластер с дикими представителями ленской популяции, аквакультурный кластер формировался из особей, начиная с 2001 года рождения. В нашем исследовании этот эффект не повторился, мы получили четкую генетическую дифференциацию особей 2022 года рождения исключительно в зависимости от их происхождения. Сибирский осетр ленской популяции domesticiрован в недавнем прошлом (1993 год) (33). В работе А.Е. Барминцевой с соавт. (32) тестирование проведено на выборках, представители которых относились к генерациям 1990-2008 годов. Если брать в расчет довольно значительный по отношению ко времени domesticiкации временной промежуток (2008-2022 годы), то вполне вероятным объяснением может оказаться постепенное накопление различий частот аллелей в современных маточных стадах сибирского осетра ленской популяции в разных хозяйствах в связи с проводимой селекционной работой. Также на выявление генетической дифференциации могло оказать влияние увеличение числа применяемых микросателлитных маркеров. Однако эти предположения нуждаются в проверке на других выборках.

Таким образом, использование разработанной нами мультилокусной

панели из их семи микросателлитных локусов даже без учета данных по дозе каждого аллеля позволяет получать для каждой особи сибирского осетра уникальный, свойственный только для нее генотип. Это делает возможным создание индивидуальных генетических паспортов. Четкая дифференциация генетической структуры экспериментальных групп сибирского осетра, происходящих из двух разных предприятий, отражает влияние проводимой в хозяйствах селекционно-племенной работы. Наличие таких генетически дифференцированных стад может в дальнейшем быть полезно при формировании новых пород и линий. Перед выпуском молоди сибирского осетра в естественные популяции целесообразно проводить сравнение генетических профилей диких и выпускаемых рыб с целью контроля и сохранения особенностей генетической структуры нативных популяций. Разработка программного обеспечения, специально предназначенного для работы с данными, включающими дозу аллелей полиплоидных локусов, представляется весьма актуальной задачей. Создание такого инструмента позволит существенно улучшить разрешающую способность генетического анализа при работе с видами, обладающими полиплоидными геномами.

Выражаем благодарность ООО РТФ «Диана», Союзу осетроводов и лично А.В. Михайлову за предоставление рыбопосадочного материала сибирского осетра. За помощь в выполнении эксперимента благодарим главного рыбовода А.П. Глебова.

ФГБНУ ФИЦ животноводства —
ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,
142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,
e-mail: bardukv-nikolajj@mail.ru, nikipelova_aminavij@mail.ru,
belousa663@gmail.com ✉, n_zinovieva@mail.ru

Поступила в редакцию
23 октября 2023 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2023, V. 58, № 6, pp. 1057-1067

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX PANEL OF MICROSATELLITES FOR GENETIC STUDIES OF SIBERIAN STURGEON (*Acipenser baerii*) BRED IN COMMERCIAL AQUACULTURE

N.V. Bardukov, A.K. Nikipelova, A.A. Belous ✉, N.A. Zinovieva

Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail bardukv-nikolajj@mail.ru, nikipelova_aminavij@mail.ru, belousa663@gmail.com (✉ corresponding author), n_zinovieva@mail.ru
ORCID

Bardukov N.V. orcid.org/0000-0002-5497-2409
Nikipelova A.K. orcid.org/0009-0002-8248-7555

Belous A.A. orcid.org/0000-0001-7533-4281
Zinovieva N.A. orcid.org/0000-0003-4017-6863

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

We express our gratitude to the fish farm Diana, the Union of Sturgeon Breeders, personally to A.V. Mikhailov for providing Siberian sturgeon fish seed material and thank the chief fish farmer A.P. Glebov for assistance in the experiment.

Supported financially by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation. state assignment No. FGGN-2022-0007

Final revision received October 23, 2023

doi: 10.15389/agrobiol.2023.6.1057eng

Accepted November 17, 2023

Abstract

The Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) is one of the most important aquaculture fish species in Russia. Due to the high demand for valuable commercial products, breeding of Siberian sturgeon is promising in the industry. However, breeding this species is significantly complicated by because of its tetraploid genome, which, together with the need to mix fish roe and sperm from several producers when obtaining offspring, prevents the introduction into practice of well-proven molecular genetic methods, e.g. microsatellite analysis. In this work, for the first time, the known microsatellite loci in the Siberian sturgeon are characterized from the point of view of the possibility of effectively accounting for the doses of their alleles in the tetraploid genome. Seven loci were found that met this criterion. The goal of our work was to create a panel of microsatellite markers adapted for use in the selection of Siberian sturgeon from the Lena population. The research was carried out

in 2023. As biological material, we used sections of fin tissue of the Siberian sturgeon of the Lena population, taken from the fish of an experimental herd kept in a closed water supply installation of the Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry. The experimental herd contained fish from the Mozhaik production and experimental fish hatchery (Goretovo village, Mozhaik urban District, Moscow Province; group I, $n = 42$) and fish obtained from RTF Diana LLC (village Kaduy, Kaduysky District, Vologda Province; group II, $n = 47$). DNA was isolated using the DNA-Extran-2 kit (NPK Synthol, Russia) according to the manufacturer's protocol. Qualitative assessment of DNA was carried out by electrophoresis in 1.2 % agarose gel. PCR was performed in a Thermal Cycler SimpliAmp amplifier (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA). Electrophoretic separation of amplification products was carried out in a Nanofor 05 capillary electrophoresis system (NPK Synthol, Russia). Allele sizes were determined using GeneMarker software (Version 3.0.1). For each locus, the dose of each allele was determined. Twenty seven microsatellite markers known for sturgeon fish species were used (Ls 19, Aox 45, Aox 9, Ls 68, Agu 38, Ag 49a, Agu 37, Agu 41, Agu 15, Agu 51, Agu 59, Agu 34, Agu 36, Agu 46, Agu 56, Agu 54, AoxD 161, AfuG 63, AfuG 51, AfuG 112, An 20, Aru 13, Aru 18, Afu 68 b, Spl 163, AfuG41, and Ls 39). Of these, seven were selected for multiplex panels (Agu 38, An 20, Aru 18, Ls 19, Ag 49a, Agu 37, Agu 41). Based on the polymorphism of seven microsatellite loci for the two studied groups of Siberian sturgeon individuals, classical population genetic indicators were calculated, the average number of alleles per locus ($N_a = 6.86$), the number of effective alleles ($N_e = 3.61$), observed ($H_o = 0.839$) and expected ($H_e = 0.6535$) heterozygosity. In the studied groups, inbreeding was not revealed ($F_{IS} = -0.340$ and -0.173) while a significant genetic differentiation occurred (Nei's $GD = 0.1340$, $F_{st} = 0.0796$). The groups formed two clear, practically non-overlapping PCA clusters despite the fact that the ancestors of Siberian sturgeon individuals in both groups were of related origin. The contribution of the allele dose of the tetraploid locus to the efficiency of microsatellite analysis was assessed. On average, the information content of each locus increased by 32 %. A comparison of the results of genetic analysis with the available research publications allows us to assume that in aquaculture herds of Siberian sturgeon from the Lena population, processes associated with changes in allele frequencies of microsatellite loci occur, which gradually enhance their genetic differentiation. As a result of the work, the high efficiency of the created panels of microsatellite markers and their potential suitability for use in genetic certification were confirmed, each individual Siberian sturgeon had its own genetic profile. The distribution of alleles at seven microsatellite loci indicated a unique genetic structure in Siberian sturgeon stocks in each of the two fish hatcheries that were sources of fish seeding material.

Keywords: Siberian sturgeon, microsatellites, tetraploids, sturgeon breeding, null alleles.

REFERENCES

1. Ashouri G., Mahboobi-Soofiani N., Hoseinifar S.H., Torfi-Mozanzadeh M., Mani A., Khosravi A., Carnevali O. Compensatory growth, plasma hormones and metabolites in juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt 1869) subjected to fasting and re-feeding. *Aquaculture Nutrition*, 2019, 26(2): 400-409 (doi: 10.1111/anu.13002).
2. Bronzi P., Rosenthal H. Present and future sturgeon and caviar production and marketing: a global market overview. *Journal of Applied Ichthyology*, 2014, 30(6): 1536-1546 (doi: 10.1111/jai.12628).
3. Bronzi P., Chebanov M., Michaels J.T., Wei Q., Rosenthal H., Gessner J. Sturgeon meat and caviar production: global update 2017. *Journal of Applied Ichthyology*, 2019, 35(1): 257-266 (doi: 10.1111/jai.13870).
4. Ruban G., Mugue N. *Acipenser baerii*. *The IUCN Red List of Threatened Species*, 2022: e.T244A156718817 (doi: 10.2305/IUCN.UK.2022-1.RLTS.T244A156718817.en).
5. Gisbert E., Williot P. Advances in the larval rearing of Siberian sturgeon. *Journal of Fish Biology*, 2002, 60(5): 1071-1092 (doi: 10.1111/j.1095-8649.2002.tb01705.x).
6. Krasil'nikova A.A., Tikhomirov A.M. Reproduction of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) viable juveniles using cryopreserved sperm and behavioral reactions of the cryo-progeny. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2018, 53(4): 762-768 (doi: 10.15389/agrobiology.2018.4.762eng).
7. Selionova M.I., Trukhachev V.I., Aybuzov A.-M.M., Stolpovsky Yu.A., Zinovieva N.A. Genetic markers of goats (review). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2021, 56(6): 1031-1048 (doi: 10.15389/agrobiology.2021.6.1031eng).
8. Abdelmanova A.S., Fornara M.S., Bardukov N.V., Sermyagin A.A., Dotsev A.V., Zinovieva N.A. Whole genome study of single nucleotide polymorphisms' associations with withers height in local and transboundary breeds in Russia. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2021, 56(6): 1111-1122 (doi: 10.15389/agrobiology.2021.6.1111eng).
9. Zhang W., Zhao J., He J., Kang L., Wang X., Zhang F., Hao C., Ma X., Chen D. Functional gene assessment of bread wheat: breeding implications in Ningxia Province. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 103 (doi: 10.1186/s12870-021-02870-5).
10. Barmintseva A.E., Mugue N.S. Natural genetic polymorphism and phylogeography of Siberian sturgeon *Acipenser baerii* Brandt, 1869. *Russian Journal of Genetics*, 2017, 53: 358-368 (doi: 10.1134/S1022795417030024).
11. Shivaramu S., Lebeda I., Vuong D.T., Rodina M., Gela D., Flajshans M. Ploidy levels and

- fitness-related traits in purebreds and hybrids originating from Sterlet (*Acipenser ruthenus*) and unusual ploidy levels of Siberian sturgeon (*A. baerii*). *Genes*, 2020, 11(10): 1164 (doi: 10.3390/genes11101164).
12. Havelka M., Bytyutskyy D., Symonová R., Ráb P., Flajšhans M. The second highest chromosome count among vertebrates is observed in cultured sturgeon and is associated with genome plasticity. *Genetics Selection Evolution*, 2016, 48: 12 (doi: 10.1186/s12711-016-0194-0).
 13. Ludwig A., Belfiore N., Pitra C., Svirsky V., Jenneckens I. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, Huso and Scaphirhynchus). *Genetics*, 2001, 158(3): 1203-1215 (doi: 10.1093/genetics/158.3.1203).
 14. Barmintseva A.E. *Filogeografiya i vnutrividovoy geneticheskoy polimorfizm sibirskogo osetra Acipenser baerii Brandt, 1869 v prirode i akvakul'ture. Kandidatskaya dissertatsiya* [Phylogeography and intraspecific genetic polymorphism of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* Brandt, 1869 in nature and aquaculture. PhD Thesis]. Moscow, 2018 (in Russ.).
 15. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance for small number of individuals. *Genetics*, 1978, 89(3): 583-590 (doi: 10.1093/genetics/89.3.583).
 16. Nielsen R., Tarpay D.R., Kern R.H. Estimating effective paternity number in social insects and the effective number of alleles in a population. *Molecular Ecology*, 2003, 12(11): 3157-3164 (doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01994.x).
 17. Weir B.S., Cockerham C.C. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 1984, 38(6): 1358-1370 (doi: 10.2307/2408641).
 18. Clark L.V., Jasieniuk M. polysat: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources*, 2011, 11(3): 562-566 (doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.02985.x).
 19. Hubisz M.J., Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 2009, 9(5): 1322-1332 (doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x).
 20. Hardy O., Vekemans X. SPAGeDI: A versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, 2002, 2(4): 618-620 (doi: 10.1046/j.1471-8286.2002.00305.x).
 21. Bruvo R., Michiels N.K., D'souza T.G., Schulenburg H. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Molecular Ecology*, 2004, 13(7): 2101-2106 (doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02209.x).
 22. Georgescu S., Canareica O., Dudu A., Costache M. Analysis of the microsatellite variation in the common hybrid between Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt and Ratzeburg, 1833) and Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) from aquaculture. Transylvanian. *Review of Systematical and Ecological Research*, 2013, 15(2): 117-124 (doi: 10.2478/trser-2013-0024).
 23. Georgescu S., Sergiu E., Canareica O., Popa G., Dudu A., Costache M. Characterization of five microsatellites in the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* from aquaculture. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2013, 46: 95-98.
 24. Kohlmann K., Kersten P., Geßner J., Eroglu, O., Firidin S., Ciorpac M., Suci R. Validation of 12 species-specific, tetrasomic microsatellite loci from the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*, for genetic broodstock management. *Aquaculture International*, 2018, 26: 1365-1376 (doi: 10.1007/s10499-018-0290-y).
 25. Smith C.T., Nelson R.J., Pollard S., Rubidge E., McKay S., Rodzen J., May B., Koop B. Population genetic analysis of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) in the Fraser River. *Journal of Applied Ichthyology*, 2002, 18(4-6): 307-312 (doi: 10.1046/j.1439-0426.2002.00418.x).
 26. Fopp-Bayat D. Microsatellite DNA variation in the Siberian sturgeon, *Acipenser baeri* (*Actinopterygii*, *Acipenseriformes*, *Acipenseridae*), cultured in a Polish fish farm. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 2010, 40(1): 21-25 (doi: 10.3750/AIP2010.40.1.03).
 27. Zhao N., Ai W., Shao Z., Zhu B., Brosse S., Chang J. Microsatellites assessment of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray) genetic variability. *Journal of Applied Ichthyology*, 2005, 21(1): 7-13 (doi: 10.1111/j.1439-0426.2004.00630.x).
 28. Cui X., Li C., Qin S., Huang Z., Gan B., Jiang Z., Huang X., Yang X., Li Q., Xiang X., Chen J., Zhao Y., Rong J. High-throughput sequencing-based microsatellite genotyping for polyploids to resolve allele dosage uncertainty and improve analyses of genetic diversity, structure and differentiation: A case study of the hexaploidy *Camellia oleifera*. *Molecular Ecology Resources*, 2022, 22(1): 199-211 (doi: 10.1111/1755-0998.13469).
 29. Dakin E.E., Avise J.C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 2004, 93: 504-509 (doi: 10.1038/sj.hdy.6800545).
 30. Parisod C., Salmon A., Zerjal T., Tenaillon M., Grandbastien M., Aïnouche M. Rapid structural andepigenetic reorganization near transposable elements in hybrid and allopolyploid genomes in *Sparganium*. *New Phytologist*, 2009, 184(4): 1003-1015 (doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03029.x).
 31. Dufresne F., Stift M., Vergilino R., Mable B.K. Recent progress and challenges in population genetics of polyploid organisms: an overview of current state-of-the-art molecular and statistical tools. *Molecular Ecology*, 2013, 23(1): 40-69 (doi: 10.1111/mec.12581).
 32. Barmintseva A.E., Myuge N.S. *Genetika*, 2018, 54: 216-223 (doi: 10.7868/S0016675818020030) (in Russ.).
 33. *Gosudarstvennyy reestr selektsionnykh dostizheniy, dopushchennykh k ispol'zovaniyu. Tom 2. Porody zhivotnykh* [State register of selection achievements approved for use. Volume 2. Animal breeds]. Moscow, 2016 (in Russ.).